

Durchflußzytometrische Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Zellen

G. Rothe, G. Valet, G. Schmitz

1 Einleitung

Durchflußzytometrische Methoden, die die spezifische Auseinandersetzung von einzelnen Zellen mit definierten Reizen erfassen, stellen ein sensitives Testsystem zur Charakterisierung von inflammatorischen, metabolischen und malignen Erkrankungen dar. Im Gegensatz zur qualitativen Analyse der konstitutiven Oberflächenantigenexpression in der Immunphänotypisierung oder der Analyse der Aneuploidie in der DNA-Analyse erlauben derartige funktionelle Zellmessungen eine Analyse pathologischer zellulärer Prozesse bereits bevor es zu einer numerischen Expansion von abnormen Zellen gekommen ist.

Wegen der Empfindlichkeit funktioneller Zelleigenschaften gegenüber Veränderungen des zellulären Milieus ist die Durchflußzytometrie prädestiniert für derartige Anwendungen. Das Prinzip der korrelierten Multiparameteranalyse erlaubt eine Analyse funktioneller Zelleigenschaften auch in unseparierten heterogenen Zellpopulationen. Methoden zur intrazellulären Detektion von Stoffwechselprozessen oder spezifischen zellulären Syntheseleistungen erlauben die sensitive Analyse von Reaktionen bereits einer Subpopulation von Zellen auf geringgradige Stimulation.

Als Parameter für die Antwort von Zellen auf die Auseinandersetzung mit einem Stimulus können als Parameter einer zellulären Aktivierung weitgehend unabhängig vom Zelltyp der Anstieg der zytosolischen freien Ca^{++} -Konzentration sowie die Alkalinisierung des Zytoplasmas gemessen werden. Spezifische funktionelle Leistungen von Zellen im Rahmen ihres inflammatorischen Potentials wie die Sauerstoffradikalproduktion und die lysosomale Proteaseaktivität, die zelluläre Phagozytoseaktivität oder die Synthese von Zytokinen im Rahmen der Immunabwehr, der zelluläre Lipidstoffwechsel oder die Expression für die Hämostase relevanter Glykoproteine können mit für die jeweiligen Zelltypen optimierten Methoden detektiert werden. Nach einer prolongierten in vitro Stimulation von Zellen unter Kulturbedingungen können genetische oder klonal erworbene Störungen des zellulären Proliferation charakterisiert werden.

Trotz der Vielzahl der in den letzten Jahren publizierten Methoden zur Analyse funktioneller Zellparameter, steht eine breitere klinische Validierung derartiger As-

says noch weitgehend aus. Ein Grund hierfür ist die hohe Komplexität von Funktionsparametern in lebenden Zellen, die eine weitgehende Standardisierung von Probengewinnung, Probenaufarbeitung, Messung und Auswertung erfordert, um Ergebnisse verschiedener Labors vergleichen zu können. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Methodenprotokolle stellen hier einen Ansatz zur Standardisierung dieser Testsysteme dar.

2 Probenaufarbeitung und Messung

Eine wesentliche Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung von Zellen *in vitro* in enger Korrelation zur *in vivo* Situation ist eine rasche und schonende Aufarbeitung der Zellen. Die Präparation der Zellen darf zu keiner Veränderung zellulärer Funktionseigenschaften führen und sollte innerhalb von 2-3 h nach Probenabnahme abgeschlossen sein. Soll das Verhalten von Zellen unter Stimulation *in vitro* analysiert werden, ist auf die Supplementierung aller für eine physiologische Antwort notwendigen Kofaktoren ähnlich der *in vivo* Situation zu achten. Die Färbung zur Detektion des zellulären Meßsignals sollte schonend sein, d. h. nicht z.B. durch Komplexbildung freier Ionen oder durch Lösungsmittelleffekte zu einer Hemmung der zellulären Aktivierbarkeit führen. Eine hohe Spezifität der Färbung sollte die Detektion definierter Stoffwechselaktivitäten von Zellen auch nach komplexer Stimulation erlauben. Wegen der häufig geringen Stabilität funktioneller Färbeansätze ist die durchflußzytometrische Analyse innerhalb einer kurzen Zeitspanne durchzuführen.

Bei der durchflußzytometrischen Analyse wird bei den meisten funktionellen Analysen eine quantitative Analyse der spezifischen zellulären Fluoreszenzsignale angestrebt. Dies macht eine genaue Kalibrierung der durchflußzytometrischen Fluoreszenzdetektion notwendig. Die Geräteeinstellung sollte hierbei über synthetische Fluoreszenzstandards langzeitstandardisiert werden. Ein besonderes methodisches Problem stellt häufig die simultane quantitative Analyse mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe dar. Wegen potentiell hoher Ungenauigkeit sollte nach Möglichkeit auf eine Fluoreszenzkomensation bei der Messung verzichtet werden. Als alternative Methode zur selektiven Analyse mehrerer Fluoreszenzsignale sollte eine sorgfältige Optimierung der verwendeten Bandpaßfilter versucht werden.

Sofern im untersuchten Zellmaterial auch nicht-vitale Zellen enthalten sind, ist eine Abgrenzung dieser Zellen zur selektiven Analyse der lebenden Zellen erforderlich. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Gegenfärbung toter Zellen mit dem rot-fluoreszenten DNA-Farbstoff Propidium Jodid dar, der von toten Zellen aufgenommen wird, von der intakten Membran lebender Zellen jedoch ausgeschlossen wird.

3 Datenauswertung

Bei der funktionellen Analyse von Zellen werden häufig sehr heterogene Zellsysteme in ihrer Interaktion untersucht. Dies führt zu einer hohen Komplexität der Auswertung dieser Messungen. Wegen der großen Unterschiede in den Stoffwechselaktivitäten und der Enzymausstattung verschiedener Zellpopulationen kommt der sicheren Abgrenzung dieser Zellen eine große Bedeutung zu. Eine wesentliche Verbesserung kann hier durch die Kombination von Auswertefenstern erreicht, die für verschiedene Meßparameter unabhängig voneinander definiert werden.

Eine Voraussetzung für die Beurteilung zellulärer Funktionseigenschaften ist häufig die Betrachtung von Zellen im Vergleich mehrerer Stimulationsansätze oder im Vergleich zu Zellen von Normalprobanden. Dies erfordert neben der Standardisierung von Probengewinnung, -aufarbeitung, und Messung auch eine standardisierte Auswertung der komplexen Listmode-Daten. Die meisten Programme zur durchflußzytometrischen Datenanalyse bieten eine Hilfestellung in Form der Abspeicherung von vordefinierten Auswertefenstern.

Sofern dem spezifischen Fluoreszenzsignal einer Zellpopulation wie z. B. bei intrazellulären Ionenmessungen, der Phagozytose von Bakterien, oder der Analyse von Expressionsdichten von Lipoproteinrezeptoren eine quantifizierbare biochemische oder biologische Größe gegenübersteht, sollte eine unmittelbare Konvertierung des zellulären Meßsignals in diese Größe angestrebt werden. So läßt sich z. B. für pH-sensitive Farbstoffe über eine Eichung der Messung in Gegenwart von Ionophoren eine Konversionstabelle zur Umrechnung eines gemessenen Quotienten der Fluoreszenz eines Farbstoffs in seiner sauren und alkalischen Form in einen pH-Wert erstellen. Alternativ sollte zumindest über einen Bezug der gemessenen Fluoreszenzwerte auf das definierte Signal von Eichpartikeln eine maschinenunabhängige Standardisierung der Meßwerte angestrebt werden.

4 Interpretation funktioneller Zellmessungen

Wegen der im Vergleich zur Immunphänotypisierung oder DNA-Analyse erst kurzen Verfügbarkeit von Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Zellen ist die klinische Evaluation dieser Methoden meistens auf kleine Spezialkollektive von Patienten beschränkt geblieben. Referenzbereiche für gesunde Probanden verschiedenen Alters sowie die genaue diagnostische Sensitivität und Spezifität der Methoden bei bestimmten Krankheiten wurden bisher nur ansatzweise charakterisiert.

Der schwierigste Schritt in der Integration funktioneller Meßmethoden in die klinische Zelldiagnostik ist wegen der nur geringen Referenzdaten die gezielte Auswahl der am besten geeigneten Testmethoden. Als erster Anhaltspunkt können hier zellbezogene Meßdaten dienen, die mit älteren nicht-durchflußzytometrischen Methoden

wie z. B. radioaktiven Proliferationsassays oder biochemischen Methoden zur extrazellulären Detektion von Stoffwechselprodukten in verschiedenen Patientenkollektiven erhoben worden sind. Wegen der geringeren Sensitivität schließt eine fehlende Diskriminierung zwischen pathologischen und Normalproben in "Bulk-Assays" eine ausreichende Erkennung krankhafter Erkennung auf Einzelzellebene jedoch keinesfalls aus.

Eine weitere Methode zur Eingrenzung der zu erwartenden Sensitivität eines funktionellen Zelltests in einem Patientenkollektiv stellt die *in vitro* Charakterisierung der Sensitivität des Zellsystems gegenüber den *in vivo* wirksamen Stimuli dar. So weist die Veränderung eines zellulären Meßsystems unter Zugabe von physiologischen Kofaktoren wie Zytokinen oder *in vivo* wirksamen Modulatoren wie spezifischen Pharmaka auf eine ausreichende Empfindlichkeit auch zur Erkennung von physiologischen Prozessen *ex vivo* hin. Erst nach der oben beschriebenen kritischen Auswahl sollte ein funktioneller Zelltest der aufwendigen Testung in definierten Patientenkollektiven unterzogen werden.

Ein rationales Vorgehen in der Etablierung von funktionellen zellulären Testsystemen sollte zu einer raschen Verbreitung und multizentrischen Evaluierung dieser neuen Meßparameter mit ihrem hohen potentiellen diagnostischen Potential führen. Die folgenden Protokolle mit einer genauen Beschreibung von Probenaufarbeitung, Färbung, Messung und Auswertung sollen hierzu einen Beitrag leisten.

Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik

Herausgeber

G. Schmitz, Regensburg

G. Rothe, Regensburg

Mit 143 Abbildungen
und 61 Tabellen



Schattauer Stuttgart
New York

Anschriften der Herausgeber:

Professor Dr. med. Gerd Schmitz
Klinikum der Universität Regensburg
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

Dr. med. Gregor Rothe
Klinikum der Universität Regensburg
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme
Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik :
mit 61 Tabellen / hrsg. von G. Schmitz ; G. Rothe. –
Stuttgart ; New York : Schattauer, 1994
ISBN 3-7945-1578-1
NE: Schmitz, Gerd [Hrsg]

In diesem Buch sind die Stichwörter, die zugleich eingetragene Warenzeichen sind, als solche nicht besonders kenntlich gemacht. Es kann also aus der Bezeichnung der Ware mit dem für diese eingetragenen Warenzeichen nicht geschlossen werden, daß die Bezeichnung ein freier Warenname ist. Hinsichtlich der in diesem Buch angegebenen Dosierungen von Medikamenten usw. wurde die größtmögliche Sorgfalt beachtet. Gleichwohl werden die Leser aufgefordert, die entsprechenden Prospekte der Hersteller zur Kontrolle heranzuziehen.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte, insbesondere das Recht des Nachdrucks, der Wiedergabe in jeder Form und die Übersetzung in andere Sprachen, behalten sich Urheber und Verlag vor. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. Das gilt insbesondere für Vervielfältigung, Übersetzung, Mikroverfilmungen und Einspeicherungen, Nutzung und Verwertung in elektronischen Systemen.

© 1994 by F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Lenzhalde 3, 70192 Stuttgart, Germany

Printed in Germany

Umschlaggrafik: Martin Wimmer
Druck und Einband: Mayr Miesbach, Druckerei und Verlag GmbH, Am Windfeld 15, 83714 Miesbach, Germany
Gedruckt auf chlor- und säurefrei gebleichtem Papier

ISBN 3-7945-1578-1